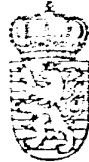


Brevet N° **85974**
du **26 juin 1985**
Titre délivré : **22 JAN. 1986**

GRAND-DUCHÉ DE LUXEMBOURG



Monsieur le Ministre
de l'Économie et des Classes Moyennes
Service de la Propriété Intellectuelle
LUXEMBOURG

Demande de Brevet d'Invention

I. Requête

Fidia S.p.A., Via Ponte della Fabbrica 3/A, I-35031 Abano Terme, représentée par **Monsieur Jean Waxweiler, 21-25 Allée Scheffer, Luxembourg,** agissant en qualité de mandataire (1)

dépose(nt) ce **vingt-six juin mil neuf cent quatre-vingt-cinq** (3)
à **15,00** heures, au Ministère de l'Économie et des Classes Moyennes, à Luxembourg :

1. la présente requête pour l'obtention d'un brevet d'invention concernant :
Mélange de gangliosides utile comme instrument thérapeutique (4)
d'élimination d'effets douloureux de neuropathies périphériques.

2. la délégation de pouvoir, datée de _____ le _____

3. la description en langue **française** de l'invention en deux exemplaires;

4. **/** planches de dessin, en deux exemplaires;

5. la quittance des taxes versées au Bureau de l'Enregistrement à Luxembourg,
le **vingt-six juin mil neuf cent quatre-vingt-cinq**

déclare(nt) en assumant la responsabilité de cette déclaration, que l'(es) inventeur(s) est (sont) :
Francesco della Valle, Via Cerato 14, I-Padova (5)

Aurelio Romeo, Viale-Ippocrate 93, I-Rome

Silvana Lorenzi, Via Euganea 108, I-35100 Padova

revendique(nt) pour la susdite demande de brevet la priorité d'une (des) demande(s) de
(6) **brevet** déposée(s) en (7) **Italie**
le **27 juin 1984** sous le No. **48491 A/84** (8)
3, 7

au nom de **Francesco della Valle, Aurelio Romeo, Silvana Lorenzi** (9)

élit(é)isent, pour lui (elle, et si désigné, pour son mandataire, à Luxembourg
Jean Waxweiler, 21-25 Allée Scheffer, Luxembourg (10)

sollicite(nt) la délivrance d'un brevet d'invention pour l'objet décrit et représenté dans les
annexes susmentionnées, — avec ajournement de cette délivrance à **/** mois. (11)

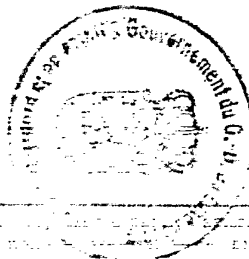
Le **Mandataire**

II. Procès-verbal de Dépôt

La susdite demande de brevet d'invention a été déposée au Ministère de l'Économie et des
Classes Moyennes, Service de la Propriété Intellectuelle à Luxembourg, en date du :

26.06.1985

à **15,00** heures



Pr. le Ministre
de l'Économie et des Classes Moyennes
p. g.

REVENDICATION DE PRIORITÉ

L-2974

Dépôt de la demande de brevet
en Italie

du 27 juin 1984

sous le numéro 48491 A/84

M E M O I R E D E S C R I P T I F

DEPOSE A L'APPUI D'UNE DEMANDE

DE BREVET D'INVENTION

AU GRAND-DUCHE DE LUXEMBOURG

par:

FIDIA S.p.A.

pour: Mélange de gangliosides utile comme instrument
thérapeutique d'élimination d'effets douloureux
de neuropathies périphériques

MELANGE DE GANGLIOSIDES UTILE COMME INSTRUMENT THERAPEUTIQUE D'ELIMINATION D'EFFETS DOULOUREUX DE NEUROPATHIES PERIPHERIQUES

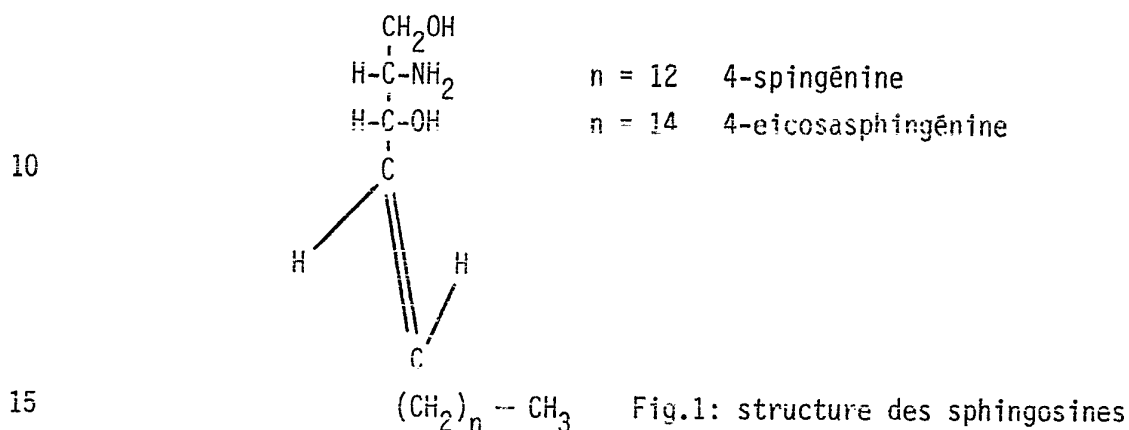
La présente invention concerne une composition spécifique constituée d'un mélange de gangliosides dont on a trouvé qu'il possédait une activité de soulagement de la douleur ou analgésique importante.

Les gangliosides représentent une famille de molécules de glycolipides complexes, composants naturels de membranes cellulaires, en particulier de la membrane des neurones. Ces composants sont impliqués dans les processus de développement, de différenciation et de régénération des neurones. Une application exogène de gangliosides leur permet de s'insérer de façon stable dans la membrane des neurones. Cette incorporation est associée à l'activation d'un système d'enzyme lié aux membranes, consistant en (Na^+ , K^+) ATPase, dont l'activité est essentielle à la conduction des impulsions nerveuses. Il a été démontré que des préparations de gangliosides possédaient une activité de stimulation de la réinnervation par amélioration du bourgeonnement nerveux, caractéristique essentielle dans les processus de réinnervation musculaire et de restauration des contacts des synaps. Des preuves électrophysiologiques et fonctionnelles d'une récupération rapide, produite par un traitement parentéral aux gangliosides, des nerfs endommagés, ont été obtenues sur plusieurs modèles d'animaux. Ceci comprend la récupération de la fonction sensorielle nerveuse après transection des nerfs, la guérison des dommages causés aux nerfs cochléaires par le bruit, la guérison des neuropathies diabétiques chez des souris diabétiques mutantes et la guérison des intoxications par les neurotoxines.

Les gangliosides sont des glycolipides acides appartenant à la famille des composés biologiques appelés glycosphingolipides. Ils sont composés de 4 unités structurelles de base: un aminoalcool à longue

chaîne, un acide gras, un radical oligosaccharide et un ou plusieurs restes sialosyles.

- 1.- L'aminoalcool à longue chaîne, présent dans les gangliosides du cerveau est la 4-sphingénine et son analogue à chaîne plus longue est la 4-eicosasphingénine; ces composés sont communément désignés sous le nom de sphingosines.



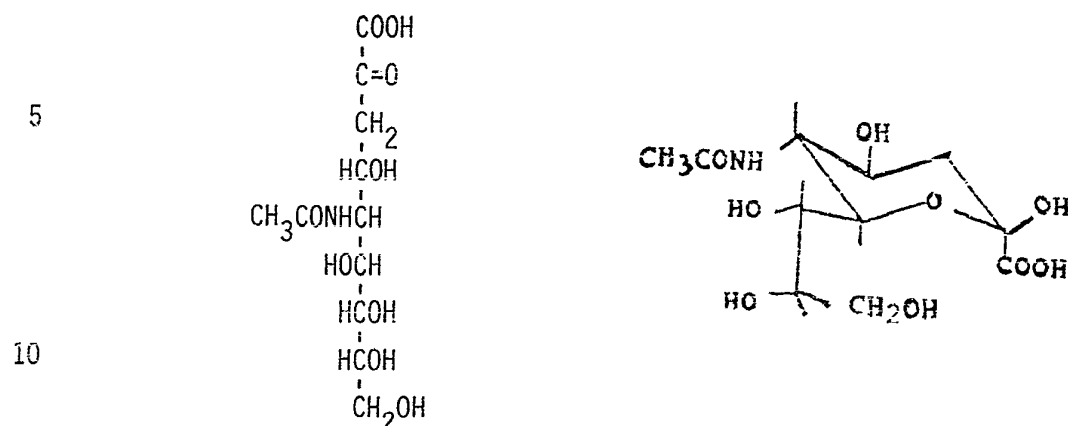
Les composés saturés correspondants (sphinganines) sont également présents en moindre proportion dans les gangliosides.

- 2.- Un acide gras est relié à la base de sphingosine au moyen d'une liaison amide. Dans les gangliosides du cerveau, cet acide gras est à plus de 95% représenté par de l'acide stéarique (18/0). On rencontre d'autres acides gras en moindre proportion: l'acide arachidique (20/0), l'acide palmitique (16/0) ou l'acide palmitoléique (16/1⁹). L'aminoalcool associé à l'acide gras forme l'unité désignée sous le nom de céramide qui représente la partie hydrophobe de la molécule de ganglioside.
- 3.- La chaîne oligosaccharide attachée au céramide est la caractéristique de la grande famille de glycosphingolipides à laquelle appartiennent les gangliosides. Les sphingolipides se classent en deux sous-groupes, sur la base de l'hydrate de carbone immédiatement rattaché au céramide. Le premier sous-groupe, le plus petit, dérive du galactosyle céramide.

La plupart des glycosphingolipides, donc sensiblement tous les gangliosides, appartiennent au sous-groupe dérivé du glucosyle céramide.

- 4.- L'acide sialique est présent dans les gangliosides du cerveau surtout sous sa forme N-acétyle mais, dans quelques espèces de gangliosides, on a également identifié la forme N-glycolyle. Ce

reste est généralement désigné sous le nom d'acide neuraminique (NANA ou NGNA).

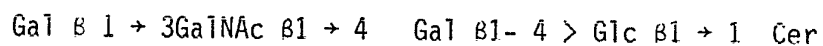


Le caractère hydrophile des gangliosides est dû à la chaîne
15 oligosaccharide et au nombre de restes sialosyles rattachés à cette chaîne.

Distribution des gangliosides

La concentration de gangliosides la plus élevée se trouve dans la
matière grise cérébrale qui contient approximativement 2,5 mmoles de
20 NANA par gramme de poids humide (approximativement 0,4% du poids sec,
0,6% du total des lipides) (Ledeen R., Salsmar K., Cabrera M., J. Lipid
Res.: 9, 129 (1968)).

90% environ de la teneur totale en gangliosides du cerveau des
mammifères est constitué de 4 gangliosides dont la séquence oligosaccha-
25 ride est identique:

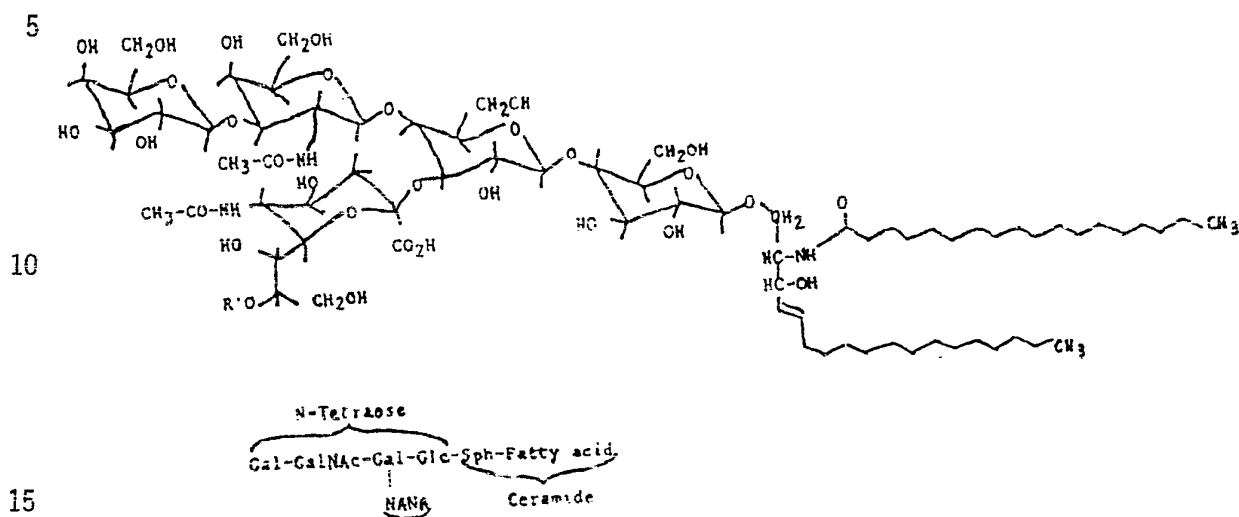


La majorité des 10% restants des gangliosides du cerveau des
mammifères est constituée de gangliosides auxquels manquent le motif
galactose terminal ou le motif galactosyle-N-acétylgalactosamine
30 (Svennerholm L., Mansson S., Li Y., J. Biol. Chem. 248: 740 (1973)).

Structure et nomenclature des gangliosides

On a isolé et purifié les gangliosides du cerveau par chromato-
graphie. La structure du ganglioside G_{M1} a été déterminée la première et
on a démontré qu'elle était commune aux quatres principaux gangliosides
35 présents dans le cerveau des mammifères. Le tableau 1 donne une descrip-
tion sommaire de leurs structures et il est suivi de descriptions
distinctes détaillées des quatre principaux gangliosides du cerveau des
mammifères.

TABEAU SOMMAIRE DE LA STRUCTURE DES GANGLIOSIDES



TABEAU 1

20 Structures des quatre principaux gangliosides du cerveau des mammifères

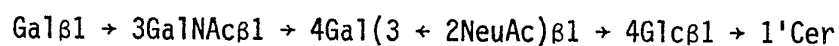
symbole selon Svennerholm*	abréviation selon IUPAC-IUB	R	R
25 G_{M1}	$II^3 \alpha\text{-NeuAc-GgOse}_r \text{Cer}$	H	H
G_{D1a}	$II^3 \alpha\text{-NeuAc-IV}^3\text{-}\alpha\text{-NeuAc-GgOse}_4 \text{Cer}$	NANA	H
G_{D1b}	$II^3 \alpha\text{-(NeuAc)-}_2\text{GgOse}_4 \text{Cer}$	H	NANA
G_{T1b}	$II^3 \alpha\text{-(NeuAc)-}_2\text{-IV}^3\text{-}\alpha\text{-NeuAc-GgOse}_4 \text{Cer}$	NANA	NANA

30 * (Svennerholm L., J. Neurochem. 10, 613 (1963)).

1.- Ganglioside G_{M1}

Le ganglioside G_{M1} présente la structure la plus simple des quatre gangliosides principaux; les autres (G_{D1a} , G_{D1b} , G_{T1b}) sont identiques à l'exception de l'addition de un ou plusieurs restes sialosyles reliés par des liaisons glycosides au radical oligosaccharide.

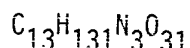
1.1 Structure



Les substituants sur l'oligosaccharide de base sont donnés au début de leur nom par un chiffre romain qui indique le reste monosaccharide (à partir du céramide) sur lequel est situé le substituant. Un chiffre arabe sur-ajouté indique la position de la liaison glycoside.

5

- 1.2 Formule empirique (Kuhn R., Wiegandt H. (1963), Chem. Ber. 96, 866)



- 1.3 Poids moléculaire

10

1536,9, calculé sur la base de 2 Gal, 1 Glc, 1 NANA, 1 GalNAc, 1 sphingosine ($C_{18:1}$), 1 acide stéarique.

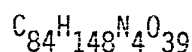
2.- Ganglioside G_{D1a}

- 2.1 Structure

NeuAc α 2 $\rightarrow$ 3Gal β 1 $\rightarrow$ 3GalNAc β 1 $\rightarrow$ 4Gal(3 $\rightarrow$ 2 α NeuAc) β 1 $\rightarrow$ 4Glc β 1 $\rightarrow$ 1'Cer

15

- 2.2 Formule empirique (Kuhn R., Wiegandt H. (1963), Chem. Ber. 96, 866)



- 2.3 Poids moléculaire

20

1838,0 calculé sur la base de 2 Gal, 1 Glc, 2 NANA, 1 GalNAc, 1 sphingosine ($C_{18:1}$), 1 acide stéarique.

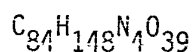
3.- Ganglioside G_{D1b}

- 3.1 Structure

Gal β 1 $\rightarrow$ 3GalNAc β 1 $\rightarrow$ 4Gal(3 $\rightarrow$ 2 α NeuAc8 $\rightarrow$ 2 α NeuAc) β 1 $\rightarrow$ 4Glc β 1 $\rightarrow$ 1'Cer

25

- 3.2 Formule empirique (Kuhn R., Wiegandt H. (1963), Chem. Ber. 96, 866)



- 3.3 Poids moléculaire

1838,0 calculé sur la base de 2 Gal, 1 Glc, 2 NANA, 1 GalNAc, 1 sphingosine ($C_{18:1}$), 1 acide stéarique.

30

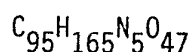
4.- Ganglioside G_{T1b}

- 4.1 Structure

NeuAc α 2 $\rightarrow$ 3Gal β 1 $\rightarrow$ 3GalNAc β 1 $\rightarrow$ 4Gal(3 $\rightarrow$ 2 α NeuAc8 $\rightarrow$ 2 α NeuAc) β 1 $\rightarrow$ 4Glc β 1 $\rightarrow$ 1'Cer

- 4.2 Formule empirique (Kuhn R., Wiegandt H. (1963), Chem. Ber. 96, 866)

35



- 4.3 Poids moléculaire

2129,4 calculé sur la base de 2 Gal, 3 NANA, 1 GalNAc, 1 sphingosine ($C_{18:1}$), 1 acide stéarique.

On a maintenant trouvé qu'un mélange particulier de gangliosides procurait à la fois une activité de stimulation de réinnervation des nerfs et une activité analgésique. On a trouvé qu'un mélange dans un rapport spécifique des gangliosides G_{M1} , G_{D1a} , G_{D1b} et G_{T1b} présentait
 5 une activité analgésique significative que l'on ne connaissait pas auparavant pour ces mélanges.

La présente invention a pour but de procurer une composition pharmaceutique constituée d'un mélange de gangliosides possédant une activité analgésique.

10 La présente invention a pour but également de procurer une composition pharmaceutique constituée d'un mélange des ganglioside G_{M1} , G_{D1a} , G_{D1b} et G_{T1b} dans des rapports de poids spécifique tel que le mélange qui en résulte possède une activité analgésique supérieure à celle des composants individuels du mélange.

15 La présente invention a pour but en outre de procurer une méthode de traitement de la douleur occasionnée par des neuropathies périphériques par administration d'une composition constituée d'un mélange de gangliosides, en particulier un mélange des gangliosides G_{M1} , G_{D1a} , G_{D1b} et G_{T1b} .

20 La présente invention a également pour objet un pansement permettant l'application externe d'une composition pharmaceutique dans lequel il est constitué de:

- (a) un support susceptible d'être appliqué à la peau, contenant une composition pharmaceutique;
- 25 (b) ladite composition pharmaceutique, constituée d'une part d'une quantité efficace pour le soulagement de la douleur, d'au moins un ganglioside choisi dans le groupe constitué par G_{M1} , G_{D1a} , G_{D1b} et G_{T1b} et, d'autre part d'un véhicule ou excipient pharmaceutiquement acceptable permettant à ces
- 30 gangliosides de passer à travers la peau.

Ces buts de l'invention et d'autres encore s'obtiennent par la préparation d'une composition qui est un mélange des gangliosides G_{M1} , G_{D1a} , G_{D1b} et G_{T1b} dans un rapport spécifique de poids. Cette composition présente une activité analgésique significative et elle est utile
 35 au traitement et au soulagement de la douleur occasionnée par divers neuropathies périphériques.

Comme on l'a discuté ci-dessus, les gangliosides représentent une famille de molécules de glycolipides complexes, composants naturels des

membranes cellulaires. Les gangliosides étant surtout associés à la membrane des neurones, il a été suggéré (Fishman et coll., Science, 194, 906-915) qu'ils pouvaient jouer un rôle dans le transfert de l'information par ces membranes. Cette suggestion a été confortée par une série d'observations impliquant ces molécules dans toute une série d'événements liés à la membrane des cellules, y compris le développement des neurones (Dimpfel W. et coll., "Gangliosides in Neurological and Neuromuscular Function, Development and Repair". Eds. Rapport and Gorio, Raven Press 119-134 (1981)), différenciation (Leon A. et coll., 1981a) 5 "Membranes in Growth & Development". Hoffman et coll., 311-320, (1981) 10 et régénération (Gorio A. et coll. "Gangliosides in Neurological and Neuromuscular Function, Development and Repair". Eds. Rapport and Gorio, Raven Press 177-195).

Il a été démontré qu'un mélange des gangliosides G_{M1} , G_{D1a} , G_{D1b} 15 et G_{T1b} purifié en vue de leur utilisation parentérale possédait une activité de stimulation de la réinnervation due à l'amélioration du bourgeonnement nerveux (Gorio A. et coll. Brain Res. 197, 236-241 (1980)). L'activité de promotion du bourgeonnement nerveux a été confirmée à la fois sur des modèles de cultures de tissus de neurones in vitro 20 (Roisen F.J. et coll., Science, 214, 577-578 (1981); Hauw J.J. et coll., Neurophysiologie. C.R. Acad. Sc. Paris, 292, (8), 569-571 (1981)) et sur des modèles de dénervation animaux in vivo (Gorio et coll., Brain Res. 197 236-241, 1980), Gorio et coll. "Nervous System Regeneration, Birch Defects; original article series", 19 (u), 157-174, 1981).

25 Les modèles animaux in vivo (dénervation d'un muscle du rat par écrasement du nerf sciatique, dénervation partielle du muscle soleus du rat par résection et dislocation de la racine nerveuse en L5) ont donné des preuves à la fois électrophysiologiques et morphologiques d'une amélioration du bourgeonnement des nerfs collatéraux, après traitement 30 par des gangliosides exogènes (5 à 50 mg/kg/j par injection IP), ce traitement conduisant à une récupération fonctionnelle rapide.

Des preuves électrophysiologiques et fonctionnelles d'une guérison accélérée de dommages nerveux produite par un traitement aux gangliosides a été décrite sur plusieurs modèles animaux, dont la récupération de 35 la fonction nerveuse sensorielle après transection des nerfs (Norido F. et coll., Experientia, 37, 301-302 (1981); la guérison d'un nerf cochléaire endommagé par le bruit (Aporti F. et coll. Nuovo Arch. Otol. Rinol. Laringol. 5, (1), 25-32 (1977); la guérison d'une neuropathie diabétique

- chez des souris atteintes d'un diabète congénital (Norido F. et coll., Muscle & Nerve), 5, 107-110 (1982)); la guérison d'une intoxication par des toxines ayant endommagées les nerfs (Aporti F. et coll., Acta Otolaryngologica, 92, 433-437, (1981); Maroni M; et coll. Clinical Toxicology 18, (12), 1475-1484 (1981).

Sur la base de ces données expérimentales, le mélange des gangliosides G_{M1} , G_{D1a} , G_{D1b} et G_{T1b} est indiqué en thérapeutique comme étant utile dans une large gamme de conditions du système nerveux périphérique dans lesquelles on peut stimuler et accélérer la réinnervation.

- 10 Ces neuropathies périphériques comprennent:

Polyneuropathies dysmétaboliques

- Neuropathie diabétique, Pozza G. et coll., "Gangliosides in Neurological and Neuromuscular Function, Development and Repair". Eds. Rapport and Gario. Raven Press 253-258 (1981); Bassi S. et coll., Muscle & Nerve, 5, 351-356 (1982); neuropathie urémique, Catizone L. et coll., Clin. Terap., 85, (4), 395 (1978).

Neuropathies mécaniques

- Le syndrome dit carpal tunnel syndrom, Trontel J.V. et coll., Effects of cerebral gangliosides in carpal tunnel syndrome (1981).
20 Communication personnelle; radiculopathie compressive, Cubells J.M. et coll., Med. Clin. (Barcelona) 75, (4), 156-160 (1980); neuropathie traumatique, Gai A.M. et coll., Europ. Medicophys., 16, (3) 221-231.

Neuropathies toxiques

- Neuropathie iatrogénique due à la vincristine, Azzoni et coll. Il Policlínico-Sez. Medica 85, (4), 255-262 (1978); neuropathie alcoolique, Mamoli B. et coll. Europ. Neurol. 19, 320-326 (1980); Bassi S. et coll., Electromyographic study of diabetic and alcoholic polyneuropathic patients treated with gangliosides. Muscle & Nerve, 5, 351-356 (1982).

Neuropathies diverses

- 30 (Bell's palsy, Negrin M. et coll., Min. Med., 69 (48), 3277-3282 (1978); syndromes menieriformes, Molino R. et coll., Giorn. It. Ric. Clin. Terap., 2, 102-106 (1978); ulcères neurotrophiques, Ferrandi C., Il Policlínico (Sez. Medica) 89 (3), 279-289 (1981)).

Méthode de Préparation

- 35 Les composants individuels des gangliosides qui forment la composition selon l'invention peuvent s'extraire par divers modes opératoires connus en soi. Par exemple, le cortex du cerveau des bovins (tissu nerveux) extrait des animaux est homogénéisé dans un tampon de phosphate

à pH 6,8. Six (6) volumes de tétrafuranne sont alors ajoutés et l'on centrifuge le mélange qui en résulte. La fraction qui surnage ou flotte en surface est ré-extraite deux fois avec du tétrahydrofuranne. Après centrifugation, les matières non polaires ou apolaires sont extraites
 5 par fractionnement avec de l'éthyléther et l'on introduit la phase de tétrahydrofuranne aqueuse dans une colonne d'échange d'ions équilibrée par de l'éthanol à 50%. Comme éluant, on utilise de l'éthanol (50%). A l'effluent de la colonne, on ajoute de l'hydroxyde de baryum et quatre volumes d'éthanol glacé. Après 18 heures dans des conditions froides, on
 10 recueille un précipité et l'on ajoute ensuite une petite quantité d'acide chlorhydrique pour la redissolution dans l'eau. Cette solution est ensuite dialysée et lyophilisée. Le rendement est d'environ 0,6 mg en ganglioside brut par gramme de tissu nerveux utilisé.

On disperse la poudre lyophilisée dans 20 volumes d'un mélange
 15 chloroforme/méthanol (2/1), on filtre la solution pour qu'elle soit claire et on fractionne par addition de 0,2 volume de solution de chlorure de potassium dans l'eau (0,88%). La phase supérieure est séparée, dialysée et lyophilisée. Le rendement final est d'environ 0,3 mg de ganglioside par gramme de tissu nerveux.

20 Pour séparer les fractions gangliosides individuelles, on utilise des colonnes d'acide silicique élué avec des mélanges méthanol/chloroforme. Avant l'utilisation en thérapeutique humaine, il faut procéder à des essais sur la matière obtenue, ces essais devant établir l'absence d'activité pyrogénique de protéines, d'activités anaphylactiques et
 25 d'histamine.

Compositions pharmaceutiques

Pour l'application thérapeutique nouvelle selon l'invention, une formulation d'un mélange de gangliosides doit contenir les gangliosides individuels dans les rapports suivants:

30	<u>Ganglioside individuel</u>	<u>% en poids</u>
	• G _{M1}	environ 19 à 23
	• G _{D1a}	environ 36 à 44
	• G _{D1b}	environ 14 à 18
	• G _{T1b}	environ 17 à 21

35 Pour une formulation que l'on préfère particulièrement, les gangliosides individuels sont combinés dans le rapport pondéral suivant:

• G _{M1}	21%
-------------------------	-----

• G _{D1a}	40%
• G _{D1b}	16%
• G _{T1b}	19%

On a également trouvé que l'activité importante de soulagement de la douleur selon la présente invention pouvait également s'obtenir par administration individuelle des gangliosides ci-dessus, sous la forme de mélanges binaires ou sous la forme d'un mélange tertiaire. Ainsi, l'un quelconque de ces gangliosides peut s'administrer sous la forme d'une fraction unique ou l'on peut préparer diverses compositions par combinaison de deux quelconques ou de trois quelconques de ces gangliosides. Par exemple, on peut administrer sous la forme de mélanges binaires le G_M et le G_{D1a}, ou le G_M et le G_{D1b}.

Pour la préparation d'une composition pharmaceutique selon l'invention, la formulation doit, de préférence, contenir un titre total en gangliosides (G_{M1} + G_{D1a} + G_{D1b} + G_{T1b}) ≥ à 95% (calculé par référence au poids sec). Les préparations peuvent être des solutions des composés gangliosides ou une poudre lyophilisée des composés associées à un ou plusieurs véhicules ou diluants pharmaceutiquement acceptables, et être contenues dans des milieux tamponnés à un pH convenable isosmotique aux liquides physiologiques. Chaque dose de mélange doit contenir d'environ 10 à 100 mg du mélange de gangliosides ou des fractions de gangliosides individuels ou de leurs mélanges binaires ou tertiaires. La dose particulière dépend de l'effet recherché et de la voie d'administration. La dose peut, par exemple, être comprise entre 0,143 et 1,43 mg de composé actif par kg de poids du corps par jour, une dose unitaire étant comprise entre 10 et 100 mg/kg de poids du corps.

On donne ci-après quelques compositions pharmaceutiques possibles:

Préparation n°1 - une fiole de 1 ml contient:

- rapport du mélange de gangliosides	100 mg
30 • G _{M1}	21 %
• G _{D1a}	40 %
• G _{D1b}	16 %
• G _{T1b}	19 %
- tampon de phosphate à pH 7,6M/100	
35 dans de l'eau bi-distillée stérile	
à pyrogène, q.s.	2 ml

Préparation n°2 - une fiole de 2 ml contient:

	- rapport du mélange de gangliosides	10 mg
	. G _{M1}	21 %
	. G _{D1a}	40 %
5	. G _{D1b}	16 %
	. G _{T1b}	19 %
	- tampon de phosphate à pH 7,6M/100 dans de l'eau bi-distillée stérile à pyrogène, q.s.	2 ml

10 Préparation n°3 - une fiole de 2 ml contient:

	- rapport du mélange de gangliosides	25 mg
	. G _{M1}	21 %
	. G _{D1a}	40 %
	. G _{D1b}	16 %
15	. G _{T1b}	19 %
	- tampon de phosphate à pH 7,6M/100 dans de l'eau bi-distillée stérile à pyrogène, q.s.	2 ml

Préparation n°4 - une fiole de 2 ml contient:

20	- rapport du mélange de gangliosides	75 mg
	. G _{M1}	21 %
	. G _{D1a}	40 %
	. G _{D1b}	16 %
	. G _{T1b}	19 %
25	- tampon de phosphate à pH 7,6M/100 dans de l'eau bi-distillée stérile à pyrogène, q.s.	2 ml

Préparation n°5 - une fiole de 2 ml contient:

	- monosialoganglioside G _{M1}	10 mg
30	- tampon de phosphate à pH 7,6M/100 dans de l'eau bi-distillée stérile à pyrogène, q.s.	2 ml

Préparation n°6 - une fiole de 2 ml contient:

	- trisialoganglioside (G _{T1b})	10 mg
35	- tampon de phosphate à pH 7,6M/100	

	dans de l'eau bi-distillée stérile	
	à pyrogène, q.s.	2 ml
	<u>Préparation n°7</u> - une fiole de 2 ml contient:	
	- un mélange binaire de fractions	
5	individuelles dans le rapport suivant	30 mg
	- monosialoganglioside G_{M1}	60 %
	- trisialoganglioside (G_{T1b})	40 %
	- tampon de phosphate à pH 7,6M/100	
10	dans de l'eau bi-distillée stérile	
	à pyrogène, q.s.	2 ml
	<u>Préparation n°8</u> - une fiole de 2 ml contient:	
	- un mélange binaire de fractions	
	individuelles dans le rapport suivant	60 mg
15	- monosialoganglioside G_{M1}	45 %
	- trisialoganglioside (G_{T1b})	55 %
	- tampon de phosphate à pH 7,6M/100	
	dans de l'eau bi-distillée stérile	
	à pyrogène, q.s.	2 ml
20	<u>Préparation n°9</u> - une fiole de 2 ml contient:	
	- un mélange ternaire de fractions	
	individuelles dans le rapport suivant	75 mg
	- monosialoganglioside G_{M1}	30 %
25	- disialoganglioside (G_{D1a} ou G_{D1b})	45 %
	- tampon de phosphate à pH 7,6M/100	
	dans de l'eau bi-distillée stérile	
	à pyrogène, q.s.	2 ml
	<u>Préparation n°10</u> - chaque emplâtre contient:	
30	- gangliosides	100 mg
	- glycérine	1,6 g
	- alcool polyvinylique	0,2 g
	- polyvinylpyrrolidone	0,1 g
	- excipient pour favoriser la péné-	
35	tration intradermique	20 g

Préparation n°11 - 100 g de crème contiennent:

	- gangliosides dans 5 g de liposomes ou phospholipides mélangés	4 g
	- monostéarate de polyéthylène	
5	glycol	15 g
	- glycérine	1,5 g
	- sorbitol	1,5 g
	- ester d'acide paraoxybenzoïque ...	0,125 g
	- eau	72,9 g

10 Propriétés pharmacologiques

Comme on l'a décrit ci-dessus, on a constaté que la composition de mélange de gangliosides et les fractions individuelles et leurs mélanges binaires et tertiaires selon l'invention était utile pour leur activité analgésique dans le soulagement des douleurs occasionnées par diverses neuropathies périphériques. On a effectué les tests suivants pour

15 montrer l'activité supérieure améliorée et inattendue de la composition selon l'invention par comparaison aux composés de gangliosides individuels.

20 Activité de soulagement de la douleur vérifiée par le test de contorsions occasionnées par la phénylbenzoquinone sur les souris

On mène l'étude en utilisant des souris Suisses mâles (26 à 28 g). On évalue la réaction douloureuse induite par injection intrapéritonéale de 0,25 ml/souris d'une solution de phénylquinone à 0,02% dans de l'alcool éthylique à 5% (contorsion).

25 Cette injection détermine une réaction pénible que l'on peut mesurer par la contorsion abdominale de l'animal.

L'étude évalue l'effet des gangliosides individuels G_{M1} , G_{D1a} , G_{D1b} et G_{T1b} , aussi bien que du mélange spécifique selon l'invention décrit ci-dessus dans la préparation n° 1 et désignée ici en abrégé sous

30 le nom de GA. Chaque ganglioside à examiner et le mélange (GA) sont administrés par voie sous-cutanée 30 mn avant la phénylquinone (solubilisation dans 10 ml/kg d'eau distillée).

Les animaux témoins reçoivent 10 ml/kg d'eau distillée par voie sous-cutanée.

35 On évalue le nombre de contorsions effectuées par chaque animal dans une période de 5 mn, (de la 5ème à la 10ème minutes après l'injection de phénylquinone, et l'on calcule ainsi le pourcentage d'inhibition de la réaction nerveuse par comparaison à celle des témoins.

Résultats du test de contorsion

Les résultats obtenus sont résumés sur le tableau 2.

TABLEAU 2

Résultats du test de contorsion par injection intrapéritonéale de
5 0,5 ml d'une solution de phénylbenzoquinone à 25% dans de
l'alcool éthylique à 5%

	traitement (S.C.)	dose mg/kg	nombre d'animaux	nombre de contorsion	inhibition %
10	contrôle (eau 10 ml par kg S.C.)	--	60	39,9 ± 0,76	--
	GA	1	6	30,3 ± 2,20	24,0
		2,5	6	17,9 ± 0,72	55,1
15		5	6	13,0 ± 0,63	66,9
		10	12	11,9 ± 0,76	70,1
		20	6	16,6 ± 0,84	58,3
		30	6	16,8 ± 1,47	57,9
		50	6	26,8 ± 1,96	32,8
20	G _{M1}	1	6	32,4 ± 1,98	18,7
		2,5	6	23,3 ± 1,40	41,6
		5	6	19,8 ± 0,60	50,3
		10	12	18,8 ± 1,28	52,8
		20	6	19,1 ± 0,89	52,1
25		30	6	19,5 ± 0,43	51,1
	G _{D1a}	5	6	34,2 ± 0,32	14,2
		10	6	20,8 ± 1,38	47,8
		20	6	20,3 ± 1,12	49,1
		30	6	20,2 ± 1,08	49,3
30	G _{D1b}	5	6	40,1 ± 0,86	-
		10	6	33,5 ± 1,43	16,0
		20	12	20,8 ± 0,54	47,8
		30	6	18,6 ± 1,09	53,3
35	G _{T1b}	1	6	34,2 ± 0,68	14,2
		2,5	6	26,8 ± 1,06	32,8
		5	6	21,8 ± 0,81	46,6
		10	6	19,6 ± 1,12	50,8
		20	6	18,1 ± 1,35	54,6
		30	6	18,3 ± 1,20	54,1

D'après les données du tableau 2, on peut voir que l'activité analgésique du mélange de gangliosides (GA) et de ses fractions individuelles a tendance à produire un effet dépendant de la dose. On a observé que l'effet maximum s'obtenait à la dose de 10 mg/kg, tandis que pour des doses plus élevées (20-30 et 50 mg/kg), l'activité diminuait progressivement, et conduisait à une courbe dose-effet en forme de cloche.

On a démontré, en outre, que l'activité analgésique des gangliosides individuels était la suivante, en allant de la plus élevée à la plus faible:

$$GA > G_{M1} > G_{T1} > G_{D1a} > G_{D1b}$$

Le pourcentage maximum de l'inhibition des contorsions obtenu par chaque ganglioside individuel ne dépasse en aucun cas une valeur maximum de 55%. En fait, l'activité a tendance à se stabiliser autour des valeurs atteintes pour la dose de 10 mg/kg sans que l'on enregistre une augmentation significative de la réponse analgésique lorsque l'on augmente encore les doses.

Si on extrapole les données des courbes dose-effet, il est clair que l'activité du mélange de gangliosides est le résultat d'une interaction entre les quatre gangliosides associés, ce qui se caractérise par un phénomène de synergie dû au rapport spécifique entre les fractions individuelles constituant le mélange total de gangliosides bien qu'il soit également démontré que les fractions individuelles présentent une bonne activité de soulagement de la douleur.

25 Utilisation thérapeutique

Les résultats expérimentaux décrits ci-dessus mettent en évidence que le mélange particulier de gangliosides selon l'invention et ses fractions individuelles possèdent une activité de soulagement de la douleur ou analgésique significative. Il en résulte que le mélange de gangliosides, ses fractions individuelles, ses mélanges binaires ou ses mélanges tertiaires, sont utiles pour soulager la douleur occasionnée par différentes neuropathies périphériques telles que les neuropathies diabétiques, les neuralgies trigéminales, la sciatique, la brachialgie cervicale, le zooster herpétique, les neuropathies post-thérapeutiques et d'autres neuropathies présentant un composant douloureux extrêmement sérieux.

Pour le traitement des pathologies ci-dessus, les gangliosides que

ce soit à titre individuel ou en mélanges binaire, tertiaire ou quaternaire, peuvent se préparer dans des formulations telles qu'en ampoule, fiole, emplâtre ou crème dûment préparées en combinaison avec un véhicule, un diluant ou un excipient pharmaceutiquement acceptable. Ces
5 formulations peuvent, en tant que de besoin, être administrées à un patient par diverses voies d'administration, y compris les voies sous-cutanée, intramusculaire, intraveineuse, topique, injection, hypodermique, hypo-dermique. Par exemple, les composés de gangliosides peuvent se formuler sous la forme d'un mélange avec un excipient approprié et se préparer sous la forme de pansement que l'on applique ensuite
10 directement à la peau et les composés passent à travers la peau à l'intérieur du patient.

L'invention ayant ainsi été décrite, il est évident que l'on peut la faire varier de diverses façons. Ces variantes ne doivent pas être
15 considérées comme s'écartant de l'esprit et de la portée de l'invention et toute modification qui sont évidentes pour l'homme de l'art doivent être comprises dans la portée des revendications suivantes.

20

25

30

35

REVENDECATIONS

1. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend une quantité, efficace pour le soulagement
5 de la douleur nerveuse périphérique, d'au moins un ganglioside choisi dans le groupe constitué par G_{M1} , G_{D1a} , G_{D1b} et G_{T1b} ainsi qu'un excipient ou véhicule pharmaceutiquement acceptable pour l'application à la peau et le passage desdits gangliosides à travers la peau.
- 10 2. Composition pharmaceutique selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle est constituée, en poids, d'environ 19 à 23% de G_{M1} , d'environ 36 à 44% de G_{D1a} , d'environ 14 à 18% de G_{D1b} et environ 17 à 21% de G_{T1b} .
- 15 3. Composition pharmaceutique selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle est constituée, en poids, d'environ 21% de G_{M1} , d'environ 36 à 40% de G_{D1a} , d'environ 16% de G_{D1b} et d'environ 19% de G_{T1b} .
- 20 4. Composition pharmaceutique selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle est constituée d'au moins deux gangliosides.
5. Composition pharmaceutique selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle est constituée d'au moins trois gangliosides.
- 25 6. Application d'au moins un ganglioside choisi dans le groupe constitué par G_{M1} , G_{D1a} , G_{D1b} et G_{T1b} pour la fabrication d'une composition pharmaceutique pour le traitement de la douleur consistant à administrer à un hôte cette composition constituée d'une quantité efficace pour le soulagement de la douleur de cet au moins un ganglioside.
- 30 7. Application d'au moins un ganglioside choisi dans le groupe constitué par G_{M1} , G_{D1a} , G_{D1b} et G_{T1b} pour la fabrication d'une composition pharmaceutique pour le traitement de la douleur occasionnée par des neuropathies périphériques consistant à administrer à un hôte cette composition comprenant une quantité efficace pour le soulagement de la douleur de cet au moins un ganglioside.
- 35 8. Application d'au moins un ganglioside choisi dans le groupe constitué par G_{M1} , G_{D1a} , G_{D1b} et G_{T1b} pour la fabrication d'une composition pharmaceutique comprenant
40

5 cet au moins un ganglioside en une quantité, efficace pour le soulagement de la douleur nerveuse, périphérique, ainsi qu'un excipient ou véhicule pharmaceutiquement acceptable pour l'application à la peau et le passage desdits gangliosides à travers la peau.

9. Application selon l'une quelconque des revendications 6 à 8, caractérisée en ce qu'elle utilise, en poids, environ 19 à 23% de G_{M1} , environ 36 à 44% de G_{D1a} , environ 14 à 18% de G_{D1b} et environ 17 à 21% de G_{T1b} .

10. Application selon l'une quelconque des revendications 6 à 8, caractérisée en ce qu'elle utilise, en poids, environ 21% de G_{M1} , environ 36 à 40% de G_{D1a} , environ 16% de G_{D1b} et environ 19% de G_{T1b} .

15 11. Application selon l'une quelconque des revendications 6 à 8, caractérisée en ce qu'elle utilise d'au moins deux gangliosides.

20 12. Application selon l'une quelconque des revendications 6 à 8, caractérisée en ce qu'elle utilise d'au moins trois gangliosides.

13. Pansement permettant l'application externe d'une composition pharmaceutique caractérisé en ce qu'il est constitué de:

- 25 (a) un support susceptible d'être appliqué à la peau contenant une composition pharmaceutique;
- (b) ladite composition pharmaceutique, constituée d'une part d'une quantité efficace pour le soulagement de la douleur, d'au moins un ganglioside choisi dans le groupe constitué par G_{M1} , G_{D1a} , G_{D1b} et G_{T1b} et, d'autre part d'un véhicule ou excipient pharmaceutiquement acceptable permettant à ces gangliosides de passer à travers la peau.

30 14. Pansement selon la revendication 13, caractérisé en ce que ladite composition est constituée d'au moins deux gangliosides.

35 15. Pansement selon la revendication 13, caractérisé en ce que ladite composition est constituée d'au moins trois gangliosides.

40 16. Pansement selon la revendication 13, caractérisé en ce que ladite composition est constituée en poids d'en-

viron 19 à 23% de G_{M1} , environ 36 à 44% de G_{D1a} , environ 14 à 18% de G_{D1b} et environ 17 à 21% de G_{T1b} .

5 12. Pansement selon la revendication 13, caractérisé en ce que ladite composition est constituée, en poids, d'environ 21% de G_{M1} , environ 36 à 40% de G_{D1a} , environ 16% de G_{D1b} et environ 19% de G_{T1b} .

10 18. Procédé de traitement de la douleur consistant à administrer à un hôte une composition constituée d'une quantité efficace pour le soulagement de la douleur d'au moins un ganglioside choisi dans le groupe constitué par G_{M1} , G_{D1a} , G_{D1b} et G_{T1b} .

15 19. Procédé de traitement de la douleur occasionnée par des neuropathies périphériques consistant à administrer à un hôte une composition comprenant une quantité efficace pour le soulagement de la douleur d'au moins un ganglioside choisi dans le groupe constitué par G_{M1} , G_{D1a} , G_{D1b} et G_{T1b} .

20 20. Procédé selon la revendication 18 ou 19, caractérisé en ce que cette composition est constituée en poids d'environ 19 à 23% de G_{M1} , d'environ 36 à 44% de G_{D1a} , d'environ 14 à 18% de G_{D1b} et d'environ 17 à 21% de G_{T1b} .

25 21. Procédé selon la revendication 18 ou 19, caractérisé en ce que cette composition est constituée en poids d'environ 21% de G_{M1} , d'environ 36 à 40% de G_{D1a} , d'environ 16% de G_{D1b} et d'environ 19% de G_{T1b} .

22. Procédé selon la revendication 18 ou 19, caractérisé en ce que cette composition comprend au moins deux gangliosides.

30 23. Procédé selon la revendication 18 ou 19, caractérisé en ce que cette composition comprend au moins deux gangliosides.